

Intérêt de la ponction épидидymaire et de la biopsie testiculaire systématique dans la prise en charge de l'azoospermie obstructive

Management of obstructive azoospermia with, both, microsurgical epididymal sperm aspiration and testicular sperm extraction

S. Salama · F. Boitrelle · M. Albert · I. Hammoud · C. Huchon · R. Wainer · J. Selva · M. Bailly

Reçu le 14 février 2012 ; accepté le 4 octobre 2012
© SALF et Springer-Verlag France 2012

Résumé *Introduction* : Dans l'azoospermie obstructive (AO), les taux d'extraction chirurgicale de spermatozoïdes sont élevés. Cependant, en ce qui concerne les issues des ICSI (*Intra cytoplasmic Sperm Injection*) chirurgicales, les données de la littérature divergent. Quels sont, dans notre équipe, les taux d'extraction de spermatozoïdes après aspiration épидидymaire (MESA) et après extraction testiculaire (TESE) dans l'AO ? Les taux de grossesses, les taux de fausses couches spontanées et d'accouchements différent-ils en fonction de l'origine du sperme ?

Matériels et méthodes : L'étude a rétrospectivement inclus 48 couples dont l'homme présente une azoospermie obstructive pure et ayant bénéficié d'un prélèvement chirurgical de spermatozoïdes associant systématiquement MESA et TESE. Les ICSI ont été réalisées de manière asynchrone. À chaque fois que cela était possible, la première ICSI a été réalisée avec des spermatozoïdes épидидymaires.

Résultats : Pour les 48 couples, 99 ICSI ont été réalisées. Quinze couples ont réalisé 24 ICSI-TESE car l'aspiration épидидymaire était négative. Onze couples ont réalisé 20 ICSI-TESE car la qualité du prélèvement épидидymaire n'était pas satisfaisante (vitalité spermatique réduite le plus souvent). Vingt-deux couples ont réalisé 22 ICSI-MESA en première intention puis en cas d'échec, 11 couples ont réalisé 12 ICSI-MESA et dix couples ont réalisé 20 ICSI-TESE.

Alors que les nombres d'ovocytes injectés ($7,1 \pm 4,1$ vs $6,9 \pm 3,6$ $P : 0,8$) et d'embryons obtenus ($4,5 \pm 3,0$ vs $4,7 \pm 2,7$; $P : 0,7$) ne sont pas significativement différents dans les deux groupes d'ICSI, les nombres d'embryons de top qualité ($2,4 \pm 1,9$ vs $3,6 \pm 2,0$ $P : 0,005$) et d'embryons congelés ($0,9 \pm 1,8$ vs $1,7 \pm 1,9$ $P : 0,04$) sont significativement supérieurs dans le groupe TESE. Le nombre de grossesses par ponction est supérieur dans le groupe TESE (58,5 % vs 26,5 %, $P : 0,002$).

Conclusion : L'approche de notre centre a la particularité d'associer systématiquement un prélèvement testiculaire au prélèvement épидидymaire chez tout homme présentant une azoospermie obstructive alors que la plupart des autres études rapportées se limitent à l'exploration épидидymaire si cette dernière est positive lors de l'examen extemporané.

Alors que classiquement, on rapporte 100% de positivité lors du prélèvement épидидymaire chez l'homme atteint d'une azoospermie obstructive, dans notre étude, plus de la moitié des explorations épидидymaires s'est avérée inexploitable. La qualité embryonnaire et les taux de grossesses sont meilleurs avec des spermatozoïdes testiculaires. L'association de ces 2 sites de prélèvement (MESA et TESE) peut être complémentaire et utile pour le couple et l'issue de sa prise en charge en AMP sans pour autant entraîner un sur-risque pour l'homme dans les suites de la chirurgie.

Mots clés Infertilité masculine · Azoospermie obstructive · Ponction épидидymaire · Biopsie testiculaire

Abstract *Introduction*: In obstructive azoospermia (OA), even if spermatozoa recovery rate are high, pregnancy rates could be lower as expected. When almost surgeons stop if they could find motile spermatozoa in the epididymis after microsurgical epididymal sperm aspiration (MESA), in our center, we add systematically a testicular biopsy with testicular sperm extraction (TESE). What are our sperm extraction rates in MESA or TESE? Are pregnancy and miscarriage rates different regarding the sperm origin?

S. Salama (✉) · C. Huchon · R. Wainer · M. Bailly
Service de gynécologie obstétrique et médecine de la reproduction, hôpital de Poissy-Saint-Germain,
10 rue du Champ Gaillard, F-78303 Poissy cedex
e-mail : Docsalama@gmail.com

S. Salama · F. Boitrelle · M. Albert · C. Huchon · J. Selva
EA 2493, Faculté des sciences,
Versailles-Saint-Quentin en Yvelines

F. Boitrelle · M. Albert · I. Hammoud · J. Selva
Laboratoire de médecine de la reproduction,
hôpital de Poissy-Saint-Germain,
10 rue du Champ Gaillard, F-78303 Poissy cedex

Material and methods: A retrospective study including 48 infertile couples with ICSI because of OA. Between 2003 and 2011, each patient had a complete aetiological exploration and a surgery with the association of MESA and TESE. ICSI were asynchronous. Each time it was possible, ICSI was realized first with epididymal spermatozoa. **Results:** For 48 couples, 99 ICSI were realized. Fifteen couples had 24 ICSI-TESE because no spermatozoon was found in MESA. Eleven couples had 20 ICSI-TESE because of bad quality of sperm recovered with MESA. Twenty-two couples had 22 ICSI-MESA in first intention. If failed, 11 couples had continued with 12 ICSI-MESA and 10 with 20 ICSI-TESE.

Although the number of injected oocytes ($7,1 \pm 4,1$ vs $6,9 \pm 3,6$ P : 0,8) and embryos ($4,5 \pm 3,0$ vs $4,7 \pm 2,7$; P : 0,7) were not significantly different in the two ICSI groups, the number of top quality embryos ($2,4 \pm 1,9$ vs $3,6 \pm 2,0$ P : 0,005) and frozen embryos ($0,9 \pm 1,8$ vs $1,7 \pm 1,9$ P : 0,04) were higher in the ICSI-TESE group. Pregnancy rate per punction (58,5% vs 26,5%, P : 0,002) was higher when testicular spermatozoa were used.

Conclusion: Our approach is original with the systematic association of MESA and TESE for each OA man, when others stop surgery when they can find spermatozoa with MESA.

We found that more than the half of epididymal explorations were not useful because negative or of bad quality. Embryo quality and per punction pregnancy rate were better with testicular spermatozoa. Association of MESA and TESE could improve the management of these infertile men without exposing them to an over surgical risk.

Keywords Male infertility · Obstructive azoospermia · Epididymal punction · Testicular biopsy · TESE · MESA

Introduction

En 1992, le développement de l'ICSI (*intracytoplasmic sperm injection*) a permis d'offrir des possibilités de grossesse à des couples dont l'homme est atteint d'une pathologie sévère de la fonction spermatique avec l'utilisation de spermatozoïdes retrouvés dans l'éjaculat [1]. Par l'absence de spermatozoïdes dans le sperme éjaculé, l'homme azoosperme est infertile. Envisager une paternité biologique devenait alors parfois possible mais au prix d'une prise en charge du couple, longue et difficile, associant une extraction chirurgicale de spermatozoïdes, à une ICSI, dont les résultats s'avéraient encourageants [2,3]. En 1993, Schoysman et al. rapportent la naissance du premier enfant né après l'injection intra-ovocytaire de spermatozoïdes d'origine testiculaire [4].

L'azoospermie atteint 1 % des hommes en population générale [5]. Elle est en cause dans 10 à 15 % des infertilités masculines [6] et représente 7,8 % des indications de fécondations in vitro (FIV) avec ICSI dans le registre FIVnat 2006. Classiquement, les causes de l'azoospermie relèvent de deux mécanismes [7] :

- dans l'azoospermie obstructive, il existe un obstacle sur les voies spermatiques excrétrices empêchant la sortie urétrale des spermatozoïdes au moment de l'éjaculation. Cette obstruction peut être d'origine congénitale (ex : agénésie bilatérale des canaux déférents) ou acquise secondairement (ex : traumatisme, infection, ou post-chirurgicale). L'obstruction peut intéresser divers niveaux éventuellement associés : l'épididyme, les canaux déférents et plus exceptionnellement, les canaux éjaculateurs ;
- dans l'azoospermie non obstructive, il existe un trouble de la spermatogenèse soit d'origine centrale due à une défaillance de l'axe hypothalamo-hypophysaire, soit d'origine périphérique avec atteinte du testicule.

Après un premier spermogramme ne retrouvant aucun spermatozoïde, avant et après centrifugation du sperme, un second examen de contrôle doit être réalisé au minimum trois mois plus tard (compte tenu de la durée de la spermatogenèse) afin de confirmer le diagnostic d'azoospermie. Après confirmation du diagnostic, la prise en charge de ces hommes repose sur un bilan complet permettant de s'orienter vers un mécanisme et une étiologie précise.

Le prélèvement chirurgical de spermatozoïdes est particulièrement indiqué dans le cadre des azoospermies obstructives où les spermatozoïdes sont correctement produits mais où les voies d'excrétion sont inexistantes ou obstruées [8]. Dans ces cas, la probabilité de retrouver des spermatozoïdes vivants dans le testicule et/ou dans l'épididyme est proche de 100 % [9]. La ponction épидидymaire est réalisée en amont de la zone obstruée, et se fait soit par voie transcutanée (PESA : *per cutaneous epididymal sperm aspiration*) [10], soit par voie chirurgicale (MESA : *microsurgical epididymal sperm aspiration*) [11]. La biopsie testiculaire (TESE : *testicular sperm extraction*) est réalisée après abord chirurgical du testicule [12]. L'extraction de spermatozoïdes vivants permet d'envisager la réalisation d'une ICSI dont le pronostic de succès est équivalent à celui des ICSI réalisées avec des spermatozoïdes éjaculés. [13–15]. Plusieurs études comparant les issues d'ICSI réalisées avec des spermatozoïdes épидидymaires ou testiculaires ne retrouvent pas de différence significative en termes de taux de fécondation, de grossesse et d'accouchement [16–18]. Chez les patients présentant une azoospermie d'origine obstructive, la plupart des équipes réalisent une MESA en première intention et si cette dernière est négative à l'examen extemporané, ils associent une TESE [19–21].

L'originalité du centre d'Assistance médicale à la procréation (AMP) de l'hôpital de Poissy-St-Germain a, depuis toujours, été d'associer une exploration testiculaire systématique dans tous les cas d'azoospermie obstructive. Ceci permet de réaliser, en une seule intervention, les étapes diagnostiques, pronostiques et thérapeutiques avec les prélèvements spermatiques (MESA et TESE) et l'examen anatomopathologique. L'ensemble des données sur les couples et les tentatives d'ICSI qui en ont découlé permettent aujourd'hui d'évaluer et de comparer les issues de chaque tentative en fonction de l'origine du spermatozoïde.

Matériels et méthodes

Étude

Il s'agit d'une étude rétrospective comparative visant à évaluer les issues de l'ensemble des tentatives d'ICSI réalisées dans le centre d'AMP de l'hôpital de Poissy-St-Germain entre le 1^{er} janvier 2003 et le 31 janvier 2011, et faisant suite à un prélèvement chirurgical de spermatozoïdes associant une MESA et une TESE chez des couples dont l'homme est atteint d'une azoospermie obstructive pure.

Population et prise en charge

Chaque patient azoosperme [22,23] a bénéficié de plusieurs spermogrammes. Un examen clinique complet (indice de masse corporelle [IMC], tabagisme, antécédents, estimation du volume testiculaire et palpation de l'épididyme et du canal déférent), des dosages hormonaux plasmatiques (FSH, LH, E2, Inhibine B, testostérone, AMH), une analyse de la biochimie séminale (dosages de l'élastase, de la L-carnitine, du fructose et de l'acide citrique) et une échographie du contenu scrotal et du carrefour prostatépididymo-déférentiel ont été réalisés à visée étiologique [24]. Une consultation génétique a été systématiquement réalisée pour chacun des couples avec la réalisation d'un caryotype en vue d'ICSI, et l'association selon l'étiologie suspectée d'une recherche d'une mutation du gène CFTR ou des microdélétions du gène DAZ.

Le caractère obstructif pur de l'azoospermie a été suspecté devant les arguments suivants :

- un contexte d'anamnèse évocateur avec des antécédents infectieux (épididymaire et/ou prostatique) ou une pathologie traumatique acquise des voies séminales ;
- des éléments cliniques évocateurs : agénésie des canaux déférents (déférents non palpables), volume testiculaire non diminué (> 12 mL), dilatation des voies séminales en amont de l'obstruction (épididymes palpables) ;
- des signes échographiques évocateurs : testicules de gros volume avec dilatation des canaux allant au rete testis,

gros épидидyme dilaté, absence uni- ou bilatérale des canaux déférents, agénésie ou hypertrophie des vésicules séminales ;

- un abaissement d'un ou des marqueurs de la biochimie séminale ;
- un bilan hormonal avec FSH et inhibine B normales ;
- absence d'anomalies génétiques autres que celles(s) du gène CFTR.

Pour chaque patiente, un examen clinique – antécédents, tabagisme, indice de masse corporelle (IMC), évaluation du cycle menstruel (durée, régularité), une étude de la fonction ovarienne (dosages plasmatiques de *follicle stimulating hormone* [FSH], *lutening hormone* [LH], œstradiol [E2], *anti-müllerian hormone* [AMH]) et un compte des follicules antraux (CFA) – et une évaluation de la cavité utérine (hystérosalpingographie et/ou hystérocopie diagnostique) ont été réalisés.

Après discussion en réunion clinico-biologique, l'indication de prélèvement chirurgical était validée. Le couple était alors informé du déroulement de l'intervention, du pronostic de succès de la récupération des spermatozoïdes et des ICSI à venir, ainsi que des complications chirurgicales possibles.

L'ensemble des prises en charge de ces couples ont été réalisées de manière asynchrone systématique puisque la gestion successive du patient (prélèvement chirurgical et congélation) puis de la patiente (stimulation folliculaire et ponction) est plus confortable, moins complexe, et que ceci ne semble pas altérer les résultats [25-27].

Technique chirurgicale

Durant les semaines précédant l'intervention, il est conseillé au patient d'arrêter la consommation de tabac et de tout autre toxique. Le jour de l'opération, le patient est admis à jeun dans le service de chirurgie ambulatoire. L'intervention se déroule au bloc opératoire, sous anesthésie générale ou sous anesthésie locale, après dépilation cutanée et désinfection cutanéomuqueuse. Dans le cas de patient avec une azoospermie obstructive, l'abord chirurgical est unilatéral dans un premier temps [28]. Après incision cutanée scrotale longitudinale de 2 à 3 cm, et ouverture du muscle crémaster et de la vaginale, le testicule est extrait de la bourse. L'exploration évalue le volume du testicule, sa consistance, la présence éventuelle d'un nodule et peut permettre de visualiser une dilatation épидидymaire. Des ponctions aspirations étagées de l'épididyme (MESA) (Fig. 1) sont réalisées avec des aiguilles à insuline de 45 gauges. Ensuite, après ouverture longitudinale de l'albuginée sur 1 cm, au niveau du pôle supérieur, une biopsie en carotte de la pulpe testiculaire est effectuée (TESE) (Fig. 2) et déposée dans un flacon contenant du milieu de culture *Flushing medium* (Origio, France) chauffé à 33°C et gazé. Chacun des prélèvements est



Fig. 1 Photographie d'une ponction-aspiration de l'épididyme (MESA : *microsurgical epididymal sperm aspiration*)



Fig. 2 Photographie d'une biopsie de la pulpe testiculaire dans la zone polaire supérieure après ouverture de l'albuginée (TESE : *testicular sperm extraction*)

immédiatement envoyé au laboratoire dans une valise thermostable et un examen extemporané est réalisé par l'équipe de biologistes. La présence de spermatozoïdes mobiles permet de surseoir à la chirurgie sur le testicule controlatéral.

Un complément d'anesthésie péricordone est réalisé avant fermeture.

Pour les prélèvements épидидymaires, un examen immédiat peropératoire microscopique du liquide épидидymaire dilué dans du milieu de culture (IVF) est réalisé. Pour la pulpe testiculaire, après pesée, sous la hotte, un petit fragment est prélevé, conservé dans le liquide de Bouin et adressé au laboratoire d'anatomopathologie pour l'évalua-

tion histologique et fonctionnelle de la spermatogenèse [29]. Le reste de la pulpe est dilacéré. La dilacération mécanique est réalisée à l'aide de scalpels dans une boîte Falcon 1006 contenant 500 μ L de *Flushing medium*. Le produit de dilacération est alors observé à l'aide d'un microscope inversé (x400). En présence de spermatozoïdes, leur numération et leur mobilité sont évaluées. Trois heures plus tard, le surnageant est prélevé et centrifugé pendant dix minutes à 1500 tours par minute. Le culot de centrifugation est repris dans un volume de 60 à 150 μ L. Deux microgouttes de 5 μ L du milieu de dilacération sont réalisées et observées sous huile dans une boîte Falcon 1006, pour mieux évaluer la numération et la mobilité spermatique. En présence de spermatozoïdes, le surnageant est cryopréservé [30]. La cryopréservation est pratiquée selon un protocole de congélation lente, en microgouttes dans des paillettes haute sécurité, immergées dans l'azote liquide à -196° avec un cryoprotecteur (*sperm freeze, ferti pro*).

Après surveillance clinique de quelques heures, le patient est informé des résultats des prélèvements et retourne à domicile avec les conseils d'usage postopératoires et des antalgiques. Le couple est revu sept jours plus tard pour une réévaluation clinique postopératoire et la programmation de la procédure d'ICSI en cas de positivité de la TESE. La testostéronémie est vérifiée six mois après l'intervention.

Technique d'ICSI

Après vérification des dispositions légales concernant la prise en charge en AMP (consentements de chacun des deux membres du couple et tests sanitaires notamment) et information sur les modalités de prise en charge pour la réalisation de l'ICSI, le praticien prescrit un traitement de stimulation multifolliculaire adapté aux données du bilan initial de la patiente. Un monitoring guidé par des échographies et un dosage hormonal de la LH et de l'E2, permet de suivre et d'adapter le traitement en fonction de la réponse ovarienne. Lorsque la réponse est jugée satisfaisante, le déclenchement de l'ovulation est réalisé et une ponction transvaginale, réalisée 35 heures après, permet de récupérer le liquide folliculaire et les ovocytes.

Il a été décidé que, dans la mesure du possible, la première ICSI serait toujours réalisée avec des spermatozoïdes épидидymaires décongelés. Après décongélation, la vitalité des spermatozoïdes est évaluée, et en cas d'absence de mobilité, un choc hypo-osmotique (HOS) est réalisé pour distinguer les spermatozoïdes vivants. Les ICSI suivantes sont réalisées soit avec des spermatozoïdes épидидymaires, sous réserve que la première ICSI MESA ait été satisfaisante, soit avec des spermatozoïdes d'origine testiculaire.

L'ICSI est réalisée selon la technique habituelle déjà décrite ainsi que l'évaluation des signes de fécondation et le développement embryonnaire (nombre de blastomères,

symétrie de leur division et pourcentage de fragments). Les embryons de type I ou II sont dits de bonne qualité (top qualité). Le transfert d'un ou deux embryons est réalisé par voie transcervicale, sous contrôle échographique.

S'il existe des embryons excédentaires de top qualité, une congélation est réalisée en vue d'un transfert secondaire. Le transfert secondaire est effectué après décongélation d'un ou deux embryons, après préparation endométriale par un traitement hormonal de substitution ou sur un cycle de stimulation monofolliculaire.

Surveillance de la grossesse

Douze jours après transfert, un dosage de l'HCG plasmatique renseigne sur la présence d'une grossesse. En cas de positivité, un contrôle de l'évolution du taux est effectué, quelques jours après. Une échographie est généralement réalisée vers sept SA pour confirmer la localisation intra-utérine de la grossesse ainsi que bonne vitalité du ou des embryons.

Une grossesse biochimique est définie par un taux plasmatique d'HCG positif mais inférieur à 1500 UI, suivi d'une mauvaise cinétique avec décroissance précoce sans image de sac gestationnel visualisable à l'échographie endovaginale. Une fausse couche spontanée précoce (FCSP) est définie par une expulsion d'un sac précédemment visualisé à l'échographie. Une grossesse extra-utérine (GEU) est affirmée après visualisation d'une image annexielle évocatrice, associée à une stagnation du taux d'HCG.

Les grossesses normalement évolutives sont suivies dans le service d'obstétrique ou par des correspondants extérieurs. Les issues de grossesse sont renseignées grâce au compte-rendu des accouchements ou grâce à des questionnaires systématiquement adressés au couple et par des relances téléphoniques.

Critères d'inclusion et d'exclusion dans l'étude

Les tentatives d'ICSI analysées répondent aux critères d'inclusion suivants :

- couple dont le partenaire est atteint d'une azoospermie obstructive pure (confirmée sur l'examen histologique qui retrouve une spermatogénèse complète et normale) ;
- prélèvement chirurgical de spermatozoïde positif en MESA et/ou TESE ;
- patiente ayant répondu à la stimulation ovarienne ;
- issue de grossesse renseignée.

Les critères d'exclusion sont :

- couple dont le partenaire est atteint d'une azoospermie non obstructive ou avec une composante mixte (analyse histologique retrouvant une spermatogénèse altérée et incomplète) ;

- absence de spermatozoïdes récupérés lors du prélèvement chirurgical ;
- échec de stimulation ovarienne ;
- ponction folliculaire blanche ;
- issue de grossesse non renseignée.

Statistiques

Les données sont présentées sous la forme de la moyenne \pm déviation standard. Les données quantitatives sont comparées par le test de Student et les données qualitatives sont comparées par le test du χ^2 à l'aide du logiciel Stata 11.0 (Stata Corp., College Station, Texas, États-Unis). Un $P < 0,05$ est considéré comme significatif.

Résultats

Population

Parmi l'ensemble des prélèvements chirurgicaux réalisés chez les patients atteints d'une azoospermie entre le 1^{er} janvier 2003 et le 31 janvier 2011, 51 ont été réalisés chez des patients ayant une azoospermie d'origine obstructive. Cependant, 48 dossiers ont été retenus, un couple n'ayant jamais fait de tentative d'ICSI, un autre ayant réalisé les ICSI dans un autre centre et la patiente d'un troisième couple n'ayant jamais répondu à la stimulation, aucune ICSI n'ayant donc pu être réalisée.

L'âge moyen des hommes au jour de la biopsie est de $35,8 \pm 7,3$ ans et l'IMC moyen de $25,0 \pm 3,1$ kg/m². Lors du bilan, les dosages hormonaux moyens sont les suivants : FSH: $4,2 \pm 2,0$ UI/L, LH: $3,4 \pm 1,5$ UI/L, testostéronémie: $6,4 \pm 3,6$ ng/mL, Inhibine B : $152,3 \pm 70,8$ pg/mL et AMH : $9,6 \pm 5,0$ ng/mL. Le volume testiculaire moyen est de $15,5 \pm 3,3$ ml (min : 12, max : 25). Le bilan étiologique de l'azoospermie a retrouvé : 17 cas d'agénésie bilatérale des canaux déférents dont dix avec une double mutation du gène CFTR, 16 cas postinfectieux, trois cas secondaires à un traumatisme, quatre cas post-chirurgie (dont deux vasectomies et un kyste), trois cas de cryptorchidies opérées. Pour cinq patients, aucune étiologie n'a été retrouvée.

L'âge moyen des femmes au moment de la prise en charge de l'homme est de $31,5 \pm 5,3$ ans. L'IMC moyen est de $24,6 \pm 5,6$ kg/m². Treize patientes ont une pathologie surajoutée compliquant la prise en charge en infertilité (deux cas avec une réserve ovarienne altérée, trois cas avec un syndrome des ovaires polykystiques, trois cas d'endométriose, un cas d'hypothyroïdie, un cas avec une muqueuse endométriale fine, et trois cas avec translocation). Lors du bilan hormonal au 3^e jour du cycle, les dosages moyens sont les suivants : FSH: $6,5 \pm 1,8$ UI/L, LH : $4,0 \pm 1,6$ UI/L, œstradiolémie:

39,6±18,8 pg/mL et AMH : 3,0±2,4 ng/mL. Toutes les patientes ont bénéficié d'un examen confirmant l'intégrité de la cavité utérine (hystérosalpingographie ou hystéroscopie diagnostique).

Pour 41 couples (85,4 %), il s'agit d'une infertilité primaire et pour sept couples (14,6 %) d'une infertilité secondaire (deux grossesses spontanées avant vasectomie, une avant chirurgie de kyste épидидymaire, quatre faisant suite à une biopsie testiculaire, sans congélation, hors centre avant 2002).

Les caractéristiques des 22 couples ayant réalisé une ICSI après ponction épидидymaire et celles des 36 couples ayant réalisé une ICSI après biopsie testiculaire sont résumées dans le Tableau 1. Dix couples ont eu à la fois des ICSI réalisées avec spermatozoïdes d'origine MESA et TESE (cinq changements MESA => TESE pour la seconde ICSI, quatre changements pour la troisième ICSI et un changement pour la quatrième ICSI). Il n'existe aucune différence significative concernant l'ensemble des caractéristiques des patientes et de leurs conjoints. Seule l'origine du spermatozoïde pourrait avoir une influence sur les issues des tentatives d'ICSI.

Prélèvement chirurgical

Quarante-huit prélèvements chirurgicaux ont été effectués au niveau de l'épididyme et du testicule. À chaque fois, la MESA et la TESE ont été réalisées. Aucune complication per- ou postopératoire n'a été observée.

Concernant la réalisation de la première ICSI après la chirurgie (Fig. 3), pour 15 des 48 patients (31,25 %), la MESA a été négative (aucun spermatozoïde), imposant donc un recours direct à une ICSI avec spermatozoïdes testiculaires (groupe A). Quand la MESA était positive, 11 prélèvements sur 33 (33,3 %) ont été jugés de qualité insuffisante (avant ou après congélation : vitalité spermatique très diminuée) imposant de réaliser l'ICSI avec des spermatozoïdes testiculaires (groupe B). Pour 22 couples, la MESA a été positive et jugée de qualité suffisante pour réaliser une ICSI avec ces spermatozoïdes en première intention (groupe C). En cas d'échec de cette première ICSI-MESA, les couples ont poursuivi soit avec une seconde ICSI-MESA (groupe D), soit avec une ICSI-TESE (groupe E).

Tableau 1 Caractéristiques des 48 couples dont ceux ayant eu une ICSI en MESA (*microsurgical epididymal sperm aspiration*) et/ou en TESE (*testicular sperm extraction*)

	Total	MESA	TESE	P value
Nombre de couples	48	22	36	
FEMME				
Âge (ans)	31,5 ±5,3	31,3 ±4,8	31,1 ±5,6	0,8
IMC (kg/m ²)	24,6 ±5,6	27,5 ±7,0	23,7 ±4,2	0,1
FSH (UI/L)	6,5 ±1,8	5,8 ±1,7	6,8 ±1,7	0,06
LH (UI/L)	4,0 ±1,6	3,7 ±1,5	3,9 ±1,6	0,6
Œstradiolémie (pg/mL)	39,6 ±18,8	37,8 ±15,4	38,6 ±20,4	0,9
AMH (ng/mL)	3,0 ±2,4	3,2 ±1,6	3,0 ±2,4	0,7
HOMME				
Âge (ans)	35,8 ±7,3	38,1 ±8,6	34,6 ±5,5	0,1
IMC (kg/m ²)	25,0±3,1	25,1 ±3,3	25,0 ±3,4	0,9
FSH (UI/L)	4,2 ±2,0	3,5 ±1,5	4,2 ±2,0	0,2
LH (UI/L)	3,4 ±1,5	3,4 ±1,3	3,3 ±1,5	0,7
Œstradiolémie (pg/mL)	24,1 ±19,5	24,6 ±27,4	24,9 ±20,8	0,9
Testostéronémie (ng/mL)	6,4 ±3,6	7,1 ±4,9	6,0 ±2,4	0,4
Inhibine B (pg/mL)	152,3 ±70,8	166,4 ±80,2	157,8 ±78,9	0,7
AMH (ng/mL)	9,6 ±5,0	10,4 ±5,7	9,8 ±4,8	0,7
Volume testiculaire droit	15,6 ±3,4	14,5 ±3,7	15,4 ±3,4	0,4
Volume testiculaire gauche	15,4±3,3	14,4 ±3,9	15,5 ±3,5	0,4
Carnitine (µg/éjac)	0,4 ±0,4	0,4 ±0,3	0,4 ±0,4	0,7
Fructose (µg/éjac)	16,0 ±19,9	12,6 ±16,2	16,3 ±20,0	0,5
Acide citrique (µg/éjac)	70,9 ±64,5	92,9 ±81,9	59,3 ±41,5	0,1
Élastase (µg/L)	260,3 ±363,1	357,2 ±429	303,3 ±395	0,8

(IMC : indice de masse corporelle, FSH : *follicle stimulating hormone*, LH : *luteinizing hormone*, AMH : *antimullerian hormone*).

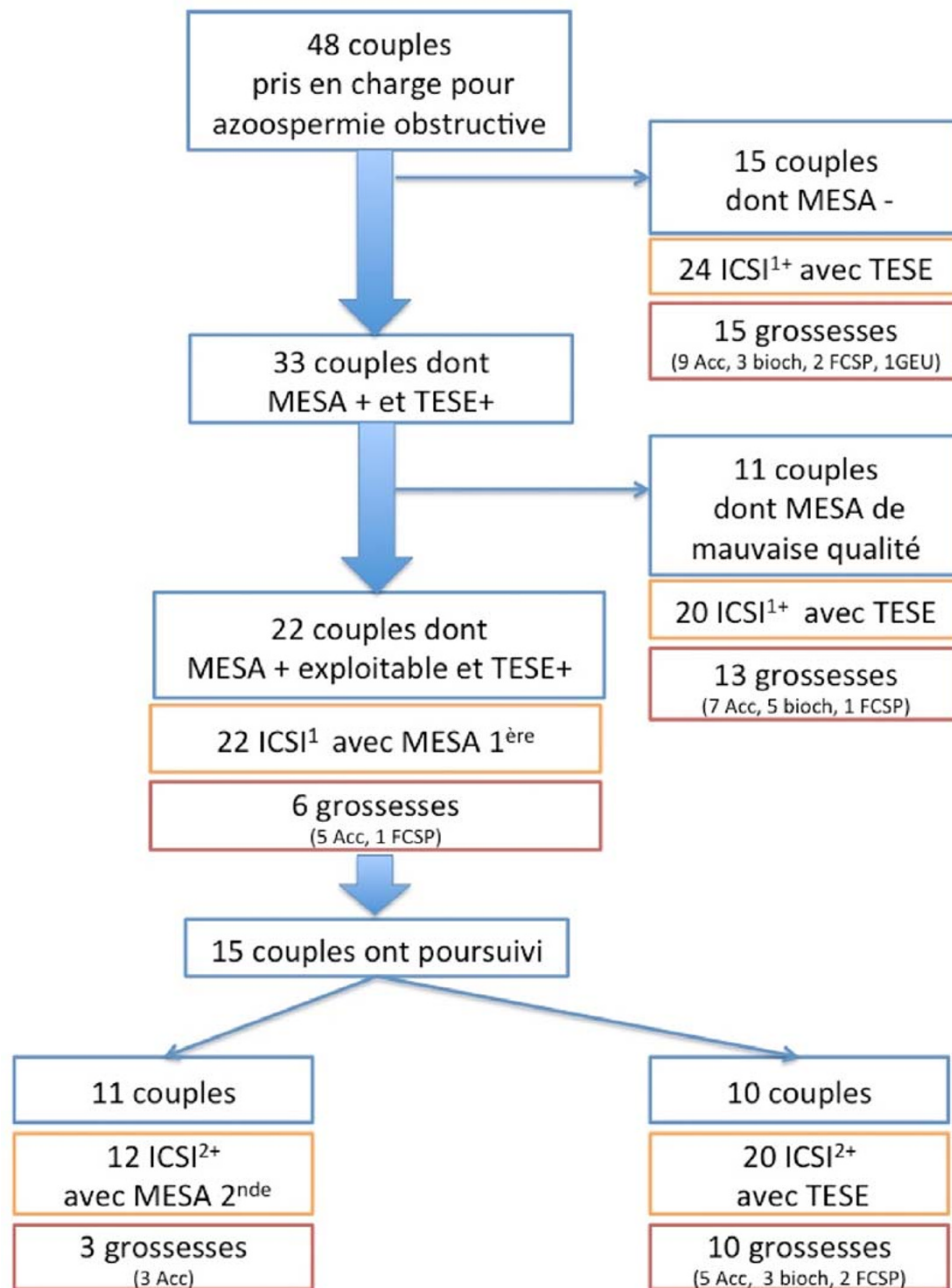


Fig. 3 Répartition des prises en charge des 48 couples en fonction de la qualité du prélèvement chirurgical de spermatozoïdes : MESA (*microsurgical epididymal sperm aspiration*) et TESE (*testicular sperm extraction*) (Acc : *Accouchement* ; Bioch : *grossesse biochimique* ; FCSP : *fausse couche spontanée précoce* ; ICSI¹ : ICSI de rang 1 exclusivement ; ICSI¹⁺ : ICSI de rang 1 et plus ; ICSI²⁺ : ICSI de rang 2 et plus)

ICSI

Au total, 99 tentatives d'ICSI ont été réalisées chez les 48 couples. Trente-quatre tentatives (34,3 %) ont été faites avec des spermatozoïdes de MESA chez 22 couples. Soixante-cinq tentatives (65,7%) ont été faites avec des

spermatozoïdes de TESE chez 36 couples. Vingt et un couples n'ont fait qu'une seule tentative d'ICSI, 13 ont fait deux tentatives, 7 ont fait trois tentatives, quatre ont fait quatre tentatives et trois ont fait cinq tentatives.

Parmi les 99 tentatives d'ICSI, 59 ont été réalisées après une stimulation ovarienne en protocole long avec un

agoniste court, 16 après un protocole long avec un agoniste long, 21 après un protocole court et trois après un protocole antagoniste (chez trois couples différents).

Le nombre moyen de jours de stimulation est de $11,5 \pm 2,0$ jours, la dose moyenne de gonadotrophines utilisées pour la stimulation est de 2443 ± 1006 UI/L et l'œstradiolémie moyenne le jour du déclenchement est de 2230 ± 1092 pg/mL. Le nombre moyen d'ovocytes obtenus à la ponction est de $8,9 \pm 4,3$, le nombre moyen d'ovocytes injectés est de $7,0 \pm 3,8$, le nombre moyen d'embryons obtenus est de $4,6 \pm 2,8$ dont $3,1 \pm 2,0$ embryons de type 1 ou 2 (Top qualité). Le nombre moyen d'embryons congelés par tentative est de $1,5 \pm 1,9$.

Au total, 292 embryons ont été transférés. Lors de l'arrêt de l'analyse, il restait 26 embryons congelés chez dix couples (dont sept qui ont déjà eu un enfant).

L'ensemble des données concernant les ICSI-MESA et TESE est résumé dans le Tableau 2. Il n'existe aucune différence significative entre les ICSI-MESA et TESE concernant l'âge moyen de la femme, la dose totale moyenne de gonadotrophines, la durée de stimulation, l'œstradiolémie moyenne au jour du déclenchement, le nombre moyen d'ovocytes recueillis, le nombre moyen d'ovocytes injectés, le nombre moyen d'embryons obtenus. Le rang moyen de tentative est significativement plus élevé dans le groupe TESE. Les nombres d'embryons de type I ou II (Top qualité) et d'embryons congelés sont significativement plus élevés dans le groupe TESE.

Issues

Les issues des 99 ICSI réalisées sont rapportées dans le Tableau 3. Le taux d'accouchement par embryon transféré

est de 9,7 %. Trente-six couples ont obtenu au moins une grossesse et vingt-cinq ont eu au moins un enfant.

Trente-huit grossesses (dont une gémellaire) sont survenues après un transfert d'embryon obtenu avec des spermatozoïdes testiculaires. Il y a eu 21 accouchements donnant naissance à 22 enfants (13 garçons, 9 filles), 11 grossesses biochimiques, cinq fausses couches spontanées au 1^{er} trimestre et une grossesse extra-utérine. Après utilisation de spermatozoïdes testiculaires, une polykystose rénale et un *metatarsus varus* bilatéral ont été rapportés chez les enfants nés.

Neuf grossesses (dont deux gémellaires) ont été obtenues avec des spermatozoïdes épидидymaires donnant lieu à huit accouchements avec naissance de dix enfants (cinq garçons et cinq filles) et une fausse couche spontanée précoce. Après utilisation de sperme épидидymaire, aucune malformation n'a été observée chez les enfants nés.

Au global, le taux de grossesse par ponction est significativement plus élevé dans le groupe TESE (58,5 % vs 26,5 %, $P : 0,002$). Les résultats des tentatives de rang 1 exclusivement pour la MESA (soit le groupe C) et pour la TESE (1^{ères} du groupe A et B), sont rapportés dans le Tableau 4.

Discussion

L'originalité de la prise en charge des azoospermies obstructives dans notre équipe est d'associer systématiquement un prélèvement testiculaire au prélèvement épидидymaire. L'analyse des tentatives d'ICSI chirurgicales a permis de mettre en évidence une hétérogénéité dans la population des couples bénéficiant d'une ICSI avec spermatozoïdes

Tableau 2 Caractéristiques des ICSI en fonction de l'origine du spermatozoïde : MESA (*microsurgical epididymal sperm aspiration*) et TESE (*testicular sperm extraction*)

ICSI	Total	MESA	TESE	P value
Nombre d'ICSI réalisées	99	34	65	
Âge de la femme	$31,8 \pm 5,0$	$31,5 \pm 4,6$	$32,0 \pm 5,2$	0,6
Rang de la tentative	$1,9 \pm 1,1$	$1,6 \pm 1,0$	$2,0 \pm 1,1$	0,04
Dose de FSH totale (UI)	2443 ± 1006	2362 ± 1056	2487 ± 984	0,6
Durée de stimulation (jours)	$11,5 \pm 2,0$	$11,6 \pm 1,8$	$11,4 \pm 2,1$	0,6
E2 au déclenchement (pg/mL)	2230 ± 1092	2127 ± 1231	2285 ± 1016	0,5
Nombre d'ovocytes recueillis	$8,9 \pm 4,3$	$8,5 \pm 4,3$	$9,1 \pm 4,4$	0,5
Nombre d'ovocytes injectés	$7,0 \pm 3,8$	$7,1 \pm 4,1$	$6,9 \pm 3,6$	0,8
Nombre d'embryons obtenus	$4,6 \pm 2,8$	$4,5 \pm 3,0$	$4,7 \pm 2,7$	0,7
Nombre d'embryons TOP	$3,1 \pm 2,0$	$2,4 \pm 1,9$	$3,6 \pm 2,0$	0,005
Nombre d'embryons congelés	$1,5 \pm 1,9$	$0,9 \pm 1,8$	$1,7 \pm 1,9$	0,04
Nombre total d'embryons transférés (TEF + TEC)	292	76	216	

E2: Œstradiolémie, TEF : transfert d'embryon(s) frais, TEC : transfert d'embryon(s) congelé(s).

Tableau 3 Issues des ICSI selon l'origine du spermatozoïde : MESA (*microsurgical epididymal sperm aspiration*) et TESE (*testicular sperm extraction*)

ICSI	Total	MESA	TESE	P value
Nombre de couples	48	22	36	
Nombre de tentatives ICSI	99	34	65	
Nombre total d'embryons transférés (TEF + TEC)	292	76	216	
Nombre de grossesse (HCG+)	47	9	38	
Taux de grossesse par ponction (%)	47,5	26,5	58,5	0,002
Taux de grossesse par embryon transféré (%)	16,1	11,8	17,6	0,2
Nombre d'accouchements	29	8	21	
Nombre d'enfants nés	32	10	22	
Nombre de couple avec au moins un enfant	25	7	18	
Taux d'accouchement (au moins un) par ponction (%)	27,1	20,6	27,7	0,4
Taux d'accouchement par embryon transféré (%)	9,7	9,2	8,3	0,8
Nombre de grossesses biochimiques	11	0	11	
Nombre d'avortements spontanés précoces	6	1	5	
Taux de pertes embryonnaires par HCG + (%)	39,1	11,1	42,1	0,1
Nombre de grossesses extra-utérines	1	0	1	
Gémellaire	3	2	1	

E2: Œstradiolémie, TEF : transfert d'embryon(s) frais, TEC : transfert d'embryon(s) congelé(s).

Tableau 4 Issues des ICSI de rang 1 exclusivement, selon l'origine du spermatozoïde : MESA (*microsurgical epididymal sperm aspiration*) et TESE (*testicular sperm extraction*)

ICSI de rang 1	MESA	TESE	P Value
Nombre de tentative	22	26	
Nombre de couple	22	26	
Nombre d'embryons transférés	52	90	
Nombre de grossesses	6	17	
Nombre d'enfants nés	7	9	
Nombre de fausses couches	1	1	
Nombres de grossesses biochimiques	0	6	
Nombre de grossesse extra-utérine	0	1	
Taux de grossesse par ponction (%)	27,3	65,4	0,008
Taux d'enfants nés par embryons transférés (%)	13,5	10,0	0,53

testiculaires : le groupe A avec prélèvement MESA négatif (15/48), le groupe B avec prélèvement MESA positif mais de trop mauvaise qualité pour réaliser l'ICSI (11/33) et le groupe E après échec d'une première ICSI en MESA (Fig. 3). Alors que le groupe des ICSI réalisées avec des spermatozoïdes MESA est homogène et comparable dans toutes les études publiées, le groupe des ICSI réalisées avec des spermatozoïdes de TESE est très hétérogène puisqu'il associe le groupe A, le groupe B et le groupe E. Le groupe

B n'est pas clairement identifiable dans les séries car tout dépend des critères et du moment d'évaluation de la qualité du prélèvement (la mauvaise qualité du prélèvement a pu être jugée en extemporané ou après la décongélation des pailles). Alors que la méta-analyse de Nicopoullos et al. [9] rapporte près de 100 % de récupération de spermatozoïdes dans le prélèvement épидидymaire, nos résultats montrent que pour 15 hommes sur 48 (31,25 %), l'exploration épидидymaire s'est avérée négative. Pour 11 hommes sur les 33 (33,3 %) dont le prélèvement épидидymaire a été positif, les spermatozoïdes testiculaires ont été utilisés pour l'ICSI en raison de la mauvaise qualité des spermatozoïdes épидидymaires avant ou après décongélation. Au total, il apparaît donc que chez 54,1 % des hommes avec une azoospermie obstructive, les prélèvements épидидymaires sont négatifs ou jugés inexploitable. Dans notre étude, aucune des situations n'est associée à une étiologie de l'azoospermie particulière.

La qualité embryonnaire et les taux de grossesses par ponction sont meilleurs avec des spermatozoïdes testiculaires. En comparant exclusivement les tentatives de rang 1 de ICSI-MESA versus première ICSI-TESE, nous retrouvons des résultats similaires. Plusieurs séries ont été publiées concernant les issues des tentatives d'ICSI après MESA et après TESE [31-35]. Les auteurs concluent qu'il n'y a pas de différence en termes de taux de fécondation, taux d'implantation, taux de grossesse clinique et taux d'accouchements en fonction de l'origine du sperme. Or toutes ses études ont été réalisées avec des couples différents, car la prise en charge initiale reposait sur l'exclusion du TESE pour les

hommes dont la MESA était positive à l'examen extemporané. Se fondant sur ces résultats, ils concluent qu'il est légitime de ne faire que des ponctions épидидymaires en première intention, car moins invasives, et de réserver la biopsie testiculaire à l'absence de spermatozoïdes mobiles à l'examen extemporané.

Le taux de perte embryonnaire (fausse couche spontanée et grossesse biochimique) est supérieur dans le groupe TESE par rapport au groupe MESA (42,1 % vs 11,1 %, $P = 0,1$). Dans notre étude, la significativité n'est pas atteinte mais peut peut-être être expliqué par de faibles effectifs. Borges et al. avaient également retrouvé ce sur-risque (12/28 vs 1/12, $P=0,01$) et avancé l'hypothèse d'anomalies génétiques [35]. Kamal et al. ne retrouvaient de différence (7,6 % vs. 18,4 %) [36]. Enfin, deux malformations néonatales ont été observées dans le groupe ICSI-TESE (polykystose rénale et metatarsus bilatéral). Ce chiffre est élevé mais une étude incluant plus de patients est nécessaire pour conclure.

Pour résumer, les spermatozoïdes d'origine testiculaire permettent d'obtenir plus d'embryons de top qualité, plus d'embryons congelables conduisant à de meilleurs taux de grossesses par ponction. Mais, en cas de grossesse, le risque de perte embryonnaire est plus important. Un certain nombre de biais limite cependant la portée de nos conclusions : le caractère rétrospectif de l'étude et les effectifs restreints de chaque groupe. Il existe peut-être aussi un effet-centre entraînant un biais de recrutement des patients : d'une part, les patients pouvant bénéficier d'une chirurgie réparatrice (anastomose) sont adressés à d'autres centres d'urologie et d'autre part un certain nombre de patients sont adressés à notre centre grâce à la présence locale de l'unité de cytogénétique.

Conclusion

Au terme de cette étude, il apparaît que le véritable enjeu n'est plus de savoir quel spermatozoïde est meilleur pour l'obtention d'une grossesse, mais quelle est la meilleure stratégie pour optimiser la prise en charge du couple infertile dont l'homme est atteint d'une azoospermie d'origine obstructive. Sachant que, chez un certain nombre de patients, les prélèvements épидидymaires seront négatifs ou inexploitable ; que, le prélèvement testiculaire complémentaire est relativement peu invasif comportant des spermatozoïdes parfois mobiles et qu'il permet un diagnostic histologique certain, diagnostiquant les blocages de la spermatogenèse [37], il nous semble judicieux d'associer systématiquement un prélèvement testiculaire au prélèvement épидидymaire.

Conflit d'intérêt : les auteurs déclarent ne pas avoir de conflit d'intérêt.

Références

1. Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC (1992) Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 340:17–8
2. Devroey P, Van Steirteghem A (2004) A review of ten years experience of ICSI. *Hum Reprod Update* 10:19–28
3. Andersen AN, Goossens V, Ferraretti AP, et al (2008) Assisted reproductive technology in Europe, 2004: results generated from European registers by ESHRE. *Hum Reprod* 23:756–71
4. Schoysman R, Vanderzwalmen P, Nijs M, et al (1993) Pregnancy after fertilisation with human testicular spermatozoa. *Lancet* 342:1237
5. Willott GM (1982) Frequency of azoospermia. *Forensic Sci Int* 20:9–10
6. Jarow JP, Espeland MA, Lipshultz LI (1989) Evaluation of the azoospermic patient. *J Urol* 142:62–5
7. Rigot JM (2009) Secretory azoospermia or non-obstructive azoospermia? *Folia Histochem Cytobiol* 47:S51–3
8. Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine in collaboration with Society for Male Reproduction and Urology (2008) The management of infertility due to obstructive azoospermia. *Fertil Steril* 90:S121–4
9. Nicopoullos JD, Ramsay JW, Almeida PA, Gilling-Smith C (2004) Assisted reproduction in the azoospermic couple. *BJOG* 111:1190–203
10. Craft IL, Khalifa Y, Boulos A, et al (1995) Factors influencing the outcome of in vitro fertilization with percutaneous aspirated epididymal spermatozoa and intracytoplasmic sperm injection in azoospermic men. *Hum Reprod* 10:1791–4
11. Temple-Smith PD, Southwick GJ, Yates CA, et al (1985) Human pregnancy by in vitro fertilization (IVF) using sperm aspirated from the epididymis. *J In Vitro Fert Embryo Transf* 2:119–22
12. Rosenlund B, Kvist U, Plöen L, et al (1998) A comparison between open and percutaneous needle biopsies in men with azoospermia. *Hum Reprod* 13:1266–71
13. Ubaldi F, Nagy ZP, Rienzi L, et al (1999) Reproductive capacity of spermatozoa from men with testicular failure. *Hum Reprod* 14:2796–800
14. Aboulghar MA, Mansour RT, Serour GI, et al (1997) Fertilization and pregnancy rates after intracytoplasmic sperm injection using ejaculate semen and surgically retrieved sperm. *Fertil Steril* 68:108–11
15. Ghazzawi IM, Sarraf MG, Taher MR, Khalifa FA (1998) Comparison of the fertilizing capability of spermatozoa from ejaculates, epididymal aspirates and testicular biopsies using intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 13:348–52
16. Silber SJ, Van Steirteghem AC, Liu J, et al (1995) High fertilization and pregnancy rate after intracytoplasmic sperm injection with spermatozoa obtained from testicle biopsy. *Hum Reprod* 10:148–52
17. Silber SJ, Devroey P, Tournaye H, Van Steirteghem AC (1995) Fertilizing capacity of epididymal and testicular sperm using intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Reprod Fertil* 7:281–92
18. Nagy Z, Liu J, Cecile J, Silber S, et al (1995) Using ejaculated, fresh, and frozen-thawed epididymal and testicular spermatozoa gives rise to comparable results after intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 63:808–15
19. Palermo GD, Schlegel PN, Hariprashad JJ, et al (1999) Fertilization and pregnancy outcome with intracytoplasmic sperm injection for azoospermic men. *Hum Reprod* 14:741–8
20. Rosenlund B, Sjöblom P, Dimitrakopoulos A, Hillensjö T (1997) Epididymal and testicular sperm for intracytoplasmic sperm injection in the treatment of obstructive azoospermia. *Acta Obstet Gynecol Scand* 76:135–9

21. Nicopoullos JD, Gilling-Smith C, Almeida PA, et al (2004) Use of surgical sperm retrieval in azoospermic men: a meta-analysis. *Fertil Steril* 82:691–701
22. Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine in collaboration with Society for Male Reproduction and Urology (2008) Evaluation of the azoospermic male. *Fertil Steril* 90:74–7
23. Huyghe E, Izard V, Rigot JM, et al (2008) Évaluation de l'homme infertile : recommandations AFU 2007. *Prog Urol* 18:95–101
24. Tournaye H, Verheyen G, Nagy P, et al (1997) Are there any predictive factors for successful testicular sperm recovery in azoospermic patients? *Hum Reprod* 12:80–6
25. Ulug U, Bener F, Karagenc L, et al (2005) Outcomes in couples undergoing ICSI: comparison between fresh and frozen-thawed surgically retrieved spermatozoa. *Int J Androl* 28:343–9
26. Cayan S, Lee D, Conaghan J, et al (2001) A comparison of ICSI outcomes with fresh and cryopreserved epididymal spermatozoa from the same couples. *Hum Reprod* 16:495–9
27. Niederberger C (2004) Do not let technician biases fool you: frozen sperm from any azoospermic man is as good as fresh for ICSI and easier for the couple. *Urology* 64:1072–4
28. Pühse G, Hense J, Bergmann M, Kliesch S (2011) Bilateral histological evaluation of exocrine testicular function in men with obstructive azoospermia: condition of spermatogenesis and andrological implications? *Hum Reprod* 26:2606–12
29. Robin G, Boitrelle F, Leroy X, et al (2010). Bilan d'une azoospermie et évaluation histologique de la spermatogenèse. *Ann Pathol* 30:182–95
30. Albert M (2005) Modalités techniques de récupération et de congélation des spermatozoïdes. *Andrologie* 15:223–6
31. Schwarzer JU, Fiedler K, v Hertwig I, et al (2003) Sperm retrieval procedures and intracytoplasmic spermatozoa injection with epididymal and testicular sperms. *Urol Int* 70:119–23.
32. Nicopoullos JD, Gilling-Smith C, Ramsay JW (2004) Does the cause of obstructive azoospermia affect the outcome of intracytoplasmic sperm injection: a meta-analysis. *BJU Int* 93:1282–6
33. Nicopoullos JD, Gilling-Smith C, Almeida PA, Ramsay JW (2004) The results of 154 ICSI cycles using surgically retrieved sperm from azoospermic men. *Hum Reprod* 19:579–85
34. Buffat C, Patrat C, Merlet F, et al (2006) ICSI outcomes in obstructive azoospermia: influence of the origin of surgically retrieved spermatozoa and the cause of obstruction. *Hum Reprod* 21:1018–24
35. Borges E Jr, Rossi-Ferragut LM, Pasqualotto FF, et al (2002) Testicular sperm results in elevated miscarriage rates compared to epididymal sperm in azoospermic patients. *Sao Paulo Med J* 120:122–6
36. Kamal A, Fahmy I, Mansour R, et al (2010) Does the outcome of ICSI in cases of obstructive azoospermia depend on the origin of the retrieved spermatozoa or the cause of obstruction? A comparative analysis. *Fertil Steril* 94:2135–40
37. Hung AJ, King P, Schlegel PN (2007) Uniform testicular maturation arrest: a unique subset of men with nonobstructive azoospermia. *J Urol* 178:608–12